

Pemanfaatan Serbuk Gergaji menjadi Biobutanol dengan Hidrolisis Selulase dan Fermentasi Bakteri *Clostridium Acetobutylicum*

Hayuni Devina Fajariah dan Wahyono Hadi

Jurusan Teknik Lingkungan, Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: wahyono@enviro.its.ac.id

Abstrak—Biobutanol adalah jenis alkohol ikatan C-4 (C_4H_9OH) yang terbuat dari biomassa. Penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan limbah kayu yang dihasilkan dari proses penggergajian kayu yang mengandung selulosa (55%), hemiselulosa (14%), dan lignin (21%). Biobutanol diproduksi dengan cara hidrolisis enzim selulase dan fermentasi bakteri *Clostridium acetobutylicum*. Variabel pada penelitian ini adalah penambahan enzim selulase pada proses hidrolisis (penambahan enzim atau tanpa penambahan enzim), pH awal proses fermentasi (5 atau 7) dan jumlah penambahan starter bakteri *Clostridium acetobutylicum* (5 atau 10 ml) dengan variasi lama proses fermentasi 2,4,6,8,10,12 hari. Parameter dalam penelitian ini adalah analisa kadar selulosa, gula tereduksi, dan kadar butanol. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa proses hidrolisis dengan penambahan enzim selulase, kondisi awal fermentasi pH 5 dan penambahan inokulum bakteri *Clostridium acetobutylicum* sebanyak 10 ml dengan lama waktu fermentasi 12 hari merupakan kondisi yang paling efektif menghasilkan kadar butanol tertinggi dari 50 gram limbah serbuk gergaji. Kadar butanol tertinggi sebesar 1,88 % dari 1 μ L sampel hasil fermentasi yang diinjeksikan ke dalam kromatografi gas.

Kata Kunci— biobutanol, *Clostridium acetobutylicum*, selulase, serbuk gergaji.

I. PENDAHULUAN

SEIRING dengan terjadinya krisis energi (kelangkaan BBM), khususnya produksi minyak bumi yang semakin menurun sehingga menyebabkan harga minyak bumi melambung tinggi, sedangkan jumlah pengguna bahan bakar semakin tahun semakin meningkat. Menurut Direktur Hulu Minyak dan Gas Bumi Kementerian ESDM Edy Hermantoro, kebutuhan BBM di Indonesia pada tahun 2012 diperkirakan mencapai 1,242 juta barel per hari, sedangkan BBM yang mampu diproduksi hanya mencapai 705.000 barel per hari. Dengan demikian, Indonesia akan mengalami defisit BBM sekitar 537.000 barel per hari atau 43 persen dari total kebutuhan 1,242 juta barel per hari [1]. Salah satu cara untuk mengurangi keterbatasan bahan bakar fosil, perlu adanya energi alternatif yang dapat diproduksi secara massal dan kontinu.

Biofuel merupakan salah satu contoh energi terbarukan yang paling mudah untuk diimplementasikan, salah satunya adalah biobutanol. Biobutanol adalah jenis alkohol ikatan C-4

(C_4H_9OH) atau butil alkohol yang terbuat dari biomassa. Biomassa merupakan energi yang tersimpan dalam bahan organik yang berasal dari pohon, tanaman pertanian dan materi hidup tanaman lainnya yang pada proses fotosintesis menghasilkan senyawa karbohidrat. Sedangkan karbohidrat merupakan senyawa organik yang membentuk biomassa.

Biobutanol diproduksi dengan cara hidrolisis menggunakan enzim selulase dan fermentasi mikroba. Sebagian besar, penelitian biobutanol menggunakan mikroorganisme anaerob dari *Clostridium sp* yang dapat mendegradasi selulosa dan hemiselulosa [2]. Salah satu bakteri genus *Clostridium* yang dapat dimanfaatkan untuk pembuatan biobutanol adalah *Clostridium acetobutylicum*. *Clostridium acetobutylicum* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan bakteri penghasil butanol lainnya. *C. acetobutylicum* merupakan bakteri anaerob, sehingga memberikan keuntungan untuk proses fermentasi selulosa yang berlangsung dalam keadaan anaerob. Selain itu, bakteri *C. acetobutylicum*, dapat bertahan pada pH rendah, antara 4,5-5 dengan suhu optimum 37°C [3].

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah Membandingkan pengaruh penambahan enzim selulase sebagai katalis terhadap proses hidrolisis selulosa serbuk gergaji menjadi glukosa, menentukan pH optimum untuk fermentasi limbah serbuk gergaji menjadi biobutanol menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* dan menentukan jumlah starter inokulum bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang efektif pada proses fermentasi serbuk gergaji.

II. METODOLOGI

A. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini berbeda-beda, hal ini sesuai dengan cara kerja yang sedang digunakan. Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah tabung fermentor, *shaker*, *electric stove*, timbangan analitik, pH meter, *autoclaved*, *centrifuge*, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, kapas lemak, bunse, korek api, tabung reaksi, jarum ose, dan kertas saring. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan adalah aquades, enzim selulase, bakteri *Clostridium*

acetobutylicum, limbah serbuk gergaji, medium agar (NA), *citric acid*, H₂SO₄ dan NaOH.

B. Prosedur

Prosedur kerja pada penelitian ini dibedakan menjadi 2 bagian, yaitu proses pretreatment dan treatment. Proses pretreatment meliputi:

1. Pembuatan ekstrak serbuk gergaji, yaitu serbuk gergaji terlebih dahulu dijemur di bawah sinar matahari selama 3 hari agar kandungan air dalam serbuk gergaji berkurang. Selanjutnya dilakukan pengayakan menggunakan ayakan santan agar diperoleh serbuk gergaji yang lebih halus. Pada proses delignifikasi atau pelepasan selulosa dan hemiselulosa dari ikatan lignin, sebanyak 50 gram ekstrak serbuk gergaji direndam pada 500 ml larutan NaOH 10% selama 60 menit disertai pemanasan 121°C dengan menggunakan *auto claved* [4].
2. Pembuatan starter *Clostridium acetobutylicum*, yaitu biakan murni bakteri *Clostridium acetobutylicum* digoreskan secara zig-zag pada media agar miring dengan menggunakan ose lalu ditumbuhkan dalam *incubator* pada suhu 37°C selama 5 hari (Cappuccino dan Sherman, 1983). Selanjutnya sebanyak 1 tabung biakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* dilarutkan ke dalam 100 ml larutan NaCl 0,9 % dengan cara melarutkan sedikit NaCl 0,9% dalam tabung sambil digoreskan pada media hingga bakteri terangkat ke atas menggunakan jarum ose. Selanjutnya starter bakteri dicampur dengan sisa NaCl yang masih ada dalam erlenmeyer dan diaduk hingga bakteri tercampur dengan larutan [5].

Sedangkan proses treatment meliputi:

1. Proses hidrolisis, yaitu serbuk gergaji yang telah didelignifikasi didinginkan hingga mendekati suhu ruangan. Selanjutnya ditambahkan 10 ml enzim selulase (berdasarkan variasi penambahan enzim). Diinkubasi dalam *shaker* 100 rpm selama 72 [4,7].
2. Proses fermentasi, yaitu setelah 3 hari proses hidrolisis, serbuk gergaji disaring untuk memisahkan filtrat dan endapannya. Filtrat hasil hidrolisis diukur pH-nya menggunakan pH meter. Rata-rata tiap sampel memiliki pH 11. Selanjutnya sampel ditambahkan dengan *citric acid* untuk menurunkan pH hingga pH larutan menjadi 5. Selanjutnya ditambahkan larutan starter sebanyak 5 ml dan 10 ml sesuai dengan variasi penambahan, kemudian difermentasi selama 12 hari di dalam inkubator 37°C. Proses fermentasi dilakukan pada kondisi anaerob menggunakan penutup. Setelah proses fermentasi selesai, tutup botol dilepas, ditutup dengan kapas lemak dan kertas coklat untuk disterilisasi menggunakan *autoclaved* selama 60 menit. Selanjutnya hasil fermentasi yang telah disterilkan diambil sebanyak 45 ml untuk di centrifuge selama 30 menit 3000 rpm sebelum dilakukan analisa kadar butanol [4].

Kemudian dilakukan pengujian terhadap pengukuran kadar selulosa, pengukuran gula tereduksi, dan pengukuran kadar butanol. Analisis selulosa menggunakan metode Chessons

(Datta, 1981), analisa kadar glukosa menggunakan metode Luff Schoorl, sedangkan analisa kromatografi gas dengan *temperatur detector* dan *injector* sebesar 270 dan 230 °C.

C. Variabel

Pada penelitian ini digunakan variasi:

1. Penambahan enzim pada proses hidrolisis: penambahan enzim dan tanpa penambahan enzim.
2. pH awal proses fermentasi: 5 dan 7.
3. Penambahan starter bakteri *Clostridium acetobutylicum*: 5 ml dan 10 ml.

Parameter yang diamati adalah kadar butanol (% dalam 45 mL sampel).

III. HASIL ANALISA DAN PEMBAHASAN

A. Pengaruh Penambahan Enzim Selulase Sebagai Katalis Terhadap Kadar Butanol

Proses hidrolisis enzim selulase berlangsung selama 3 hari dengan dilakukan pengadukan menggunakan *shaker* dengan kecepatan putaran 100 rpm. Sehingga enzim selulase yang dicampurkan dapat bercampur rata dengan sampel dan gula yang dihasilkan pada proses hidrolisis semakin meningkat. Setelah proses hidrolisis selama 3 hari selanjutnya sampel diatur pH-nya sesuai dengan variasi sampel yaitu 5 dan 7. Selanjutnya tiap sampel ditambahkan bakteri *Clostridium acetobutylicum* kemudian difermentasi hingga 12 hari. Hasil fermentasi selanjutnya dianalisis kadar butanolnya menggunakan metode gas kromatografi.

Pertama-tama temperatur detector dan inlet kromatografi diatur terlebih dahulu pada suhu 250°C. Selain itu, beberapa hal yang harus diatur pada kondisi kerja alat kromatografi adalah laju alir gas pembawa, besar arus yang melalui detector, attenuator, kecepatan kertas rekorder, dan posisi pen pada rekorder. Penyiapan larutan standar yaitu butanol murni dilakukan dengan menggunakan jarum suntik sebanyak 1 µL dan disuntikkan ke dalam kromatograf. Ditunggu hingga terlihat titik puncak dan waktu retensi tiap senyawa yang diujikan. Selanjutnya sampel yang akan diujikan disuntikkan dengan cara yang sama ke dalam kromatografi (GC) dan diamati waktu retensi, luas puncak dan lebar puncak yang tercetak pada kertas. Luas area butanol pada sampel dibandingkan dengan luas area butanol pada larutan standar butanol. Sehingga didapatkan % kadar butanol pada sampel. Persamaan metode pembacaan kadar butanol adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar Butanol} = \frac{\text{Area}[uV * S]_{\text{sampel}}}{\text{Area}[uV * S]_N} \times 100\%$$

Keterangan:

Area[uV*S]_{sampel} : Luas area N-Butanol sampel
 Area[uV*S]_N : Luas area N-Butanol larutan standar
 (Surayya dan Sukandar, 2008)

Berdasarkan hasil analisis kadar butanol yang tercetak pada kertas kromatograf, didapatkan perbandingan variasi

penambahan enzim dengan kadar butanol yang dihasilkan dan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1.

Perbandingan Kadar Butanol dengan Variasi Penambahan Enzim Selulase

Penambahan Enzim	pH	Konsentrasi Bakteri	Kadar Butanol (%)					
			Lama Waktu Fermentasi (Hari)					
			2	4	6	8	10	12
Enzim Selulase	5	5 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,55
		10 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	1,34	1,88
	7	5 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07
		10 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25
Tanpa Enzim Selulase	5	5 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		10 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
	7	5 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		10 ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21

Sumber: Hasil Perhitungan

Berdasarkan tabel di atas diketahui bahwa variasi penambahan enzim selulase sangat berpengaruh terhadap proses hidrolisis. Kadar butanol pada sampel yang ditambahkan enzim selulase, pH awal fermentasi 5 dengan inokulum 10 ml menghasilkan butanol pada rentang fermentasi 10 hingga 12 hari lebih besar dari pada variasi tanpa penambahan enzim, yakni sebesar 1,88%. Hal ini disebabkan oleh enzim selulase memecahkan ikatan kompleks selulosa menjadi ikatan yang lebih sederhana yaitu gula. Gula hasil hidrolisis ini pada proses selanjutnya akan difermentasi oleh bakteri menjadi bentuk hidrokarbon butanol. Sedangkan pada variasi hidrolisis tanpa penambahan enzim, pada rentang fermentasi 10 hari belum menghasilkan butanol. Hal ini karena kadar gula yang dihasilkan pada proses hidrolisis sangat sedikit. Sehingga kadar butanol yang dihasilkan sangat sedikit hingga mendekati angka nol.

B. pH Optimum Fermentasi Limbah Serbuk Gergaji Menjadi Biobutanol

pH sangat berpengaruh pada proses fermentasi. pH medium fermentasi penting untuk pertumbuhan bakteri, karena enzim-enzim tertentu hanya akan mengurai substrat sesuai dengan aktivitasnya pada pH tertentu yang disebut sebagai pH optimum. Oleh karena itu, pengaturan pH sangat penting dalam proses fermentasi. pH optimum pertumbuhan bakteri *Clostridium acetobutylicum* berada pada rentang 4,5-5. Pada penelitian ini, pH yang digunakan adalah pH 5 dan pH netral yaitu 7. pH awal pada proses hidrolisis >12 sehingga sebelum proses fermentasi dilakukan penyesuaian pH pada sampel sesuai dengan variasi pH awal fermentasi. Yakni menggunakan larutan citric acid 40% dan larutan NaOH 20% untuk menurunkan pH menjadi 5 dan 7. Perbandingan variasi pH awal fermentasi dengan kadar butanol yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1.

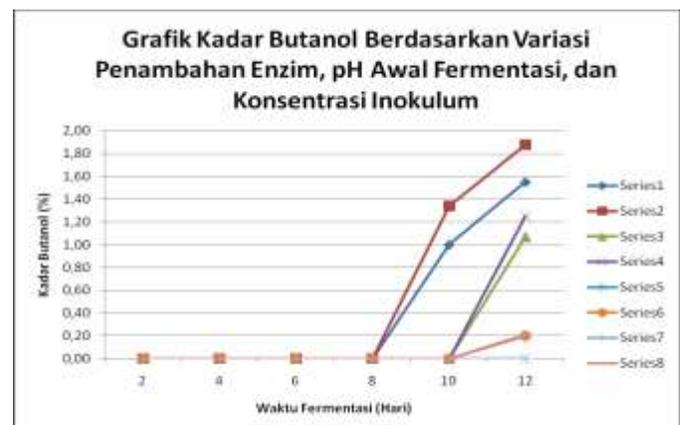
Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui kadar butanol pada sampel pada waktu fermentasi 12 hari dengan variasi pH 5 lebih besar dari pada variasi pH 7. Hal ini disebabkan oleh

rentang pH optimum bakteri *Clostridium acetobutylicum* berada pada rentang pH 4,5-5 [3]. Sehingga bakteri dapat memfermentasi gula menjadi butanol. Hal ini sesuai pada penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa pH fermentasi optimum bakteri *Clostridium acetobutylicum* adalah pH 5 [4]. Sedangkan pada pH awal fermentasi 7 kemungkinan bakteri *Clostridium acetobutylicum* tidak aktif bekerja memproduksi senyawa butanol. Sebagian besar bakteri dengan genus *Clostridium sp.* tidak dapat hidup pada pH netral.

C. Pengaruh Jumlah Penambahan Inokulum Pada Proses Fermentasi Terhadap Kadar Butanol

Fermentasi butanol pada kondisi anaerob ini dilakukan pada berbagai konsentrasi inokulum yang berbeda yaitu 5 ml dan 10 ml. Bakteri yang didapat dari Laboratorium Bioteknologi UGM ini selanjutnya diinokulasi pada tabung-tabung reaksi dan diinkubasi selama 5 hari dengan suhu 37 °C. Hasil bakteri yang telah diinokulasi selanjutnya dilarutkan dengan larutan NaCl 0,5% agar membentuk fraksi cair sehingga mempermudah pada proses penambahan inokulum. Sampel yang telah dihidrolisis menggunakan atau tanpa menggunakan enzim selulase selanjutnya ditambahkan dengan inokulum bakteri *Clostridium acetobutylicum* sesuai dengan variasi yaitu 5 dan 10 ml. Selanjutnya media fermentasi diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator. Fermentasi berlangsung selama 12 hari dengan pengukuran kadar butanol setiap 2 hari sekali.

Sebagian besar, penelitian biobutanol menggunakan mikroorganisme anaerob dari *Clostridium sp* yang dapat mendegradasi selulosa dan hemiselulosa [2]. Salah satu bakteri genus *Clostridium* yang dapat dimanfaatkan untuk pembuatan biobutanol adalah *Clostridium acetobutylicum*. *Clostridium acetobutylicum* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan bakteri penghasil butanol lainnya. *C.acetobutylicum* merupakan bakteri anaerob, sehingga memberikan keuntungan pada proses fermentasi selulosa yang berlangsung dalam keadaan anaerob. Selain itu, bakteri *C.acetobutylicum*, dapat bertahan pada pH rendah, antara 4,5-5 dengan suhu optimum 37°C [3]. Kadar butanol yang dihasilkan dari proses fermentasi selama 12 hari dengan berbagai variasi dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1.

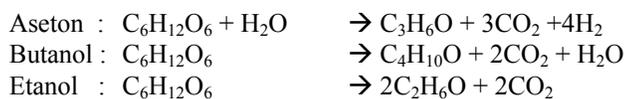


Gambar 1. Grafik Kadar Butanol dari Berbagai Variasi

Keterangan:

- Series 1 = Variasi Enzim Selulase, pH 5, Konsentrasi inokulum 5 ml
 Series 2 = Variasi Enzim Selulase, pH 5, Konsentrasi inokulum 10 ml
 Series 3 = Variasi Enzim Selulase, pH 7, Konsentrasi inokulum 5 ml
 Series 4 = Variasi Enzim Selulase, pH 7, Konsentrasi inokulum 10 ml
 Series 5 = Variasi Tanpa Enzim Selulase, pH 5, Konsentrasi inokulum 5 ml
 Series 6 = Variasi Tanpa Enzim Selulase, pH 5, Konsentrasi inokulum 10 ml
 Series 7 = Variasi Tanpa Enzim Selulase, pH 7, Konsentrasi inokulum 5 ml
 Series 8 = Variasi Tanpa Enzim Selulase, pH 7, Konsentrasi inokulum 10 ml

Pada fermentasi glukosa oleh bakteri *Clostridium acetobutylicum* ini, glukosa diubah menjadi larutan aseton-butanol-etanol (ABE), sisa glukosa, gas CO₂, dan H₂O. Reaksi pembentukan aseton, butanol, dan etanol adalah sebagai berikut:



[8]

Berdasarkan Tabel 1, diketahui bahwa kadar butanol dengan konsentrasi inokulum 10 ml lebih besar dibanding dengan konsentrasi inokulum 5 ml yakni pada waktu fermentasi 12 hari, proses hidrolisis penambahan enzim dan pH awal proses fermentasi 5 sebesar 1,88%. Berbeda dengan variasi-variasi sampel yang lain, misalnya pada variasi penambahan enzim, pH awal 5 dengan inokulum 5 ml, kadar butanol yang dihasilkan hanya 1,55%. Hal ini disebabkan oleh jumlah bakteri yang lebih sedikit sehingga kurangnya bakteri yang memfermentasi gula menjadi senyawa butanol. Sedangkan pada variasi sampel tanpa penambahan enzim, kadar butanol yang dihasilkan sangat sedikit hingga pada kurva Gas Kromatografi sangat sulit dibaca karena mendekati angka nol.

Dari Tabel 1 juga diketahui bahwa proses pembentukan butanol baru terjadi pada waktu fermentasi 10-12 hari. Hal ini disebabkan oleh aktifasi bakteri baru terjadi pada waktu fermentasi 10-12 hari karena keadaan inhibitor atau pengaruh kondisi ketersediaan oksigen pada proses fermentasi sehingga bakteri mengalami proses tidak aktif sehingga tidak bisa memfermentasi gula dalam sampel. Sedangkan pada penelitian sebelumnya, aktifitas bakteri memproduksi butanol sudah berlangsung pada hari ke-1 dan produksi butanol optimum pada hari ke-6 [4]. Hal ini disebabkan oleh starter bakteri yang digunakan ditumbuhkan pada media yang memiliki komposisi yang sama dengan media pertumbuhan sebelumnya. Sedangkan pada penelitian ini, starter tidak ditumbuhkan pada media serbuk gergaji. Sehingga mikroorganisme membutuhkan waktu yang lebih lama untuk beradaptasi dengan lingkungan

yang baru sebelum memulai pertumbuhannya. Fase adaptasi ini disebut juga dengan fase log. Fase log ini akan pendek jika inokulum yang digunakan adalah bakteri pada media yang memiliki komposisi sama dengan media pertumbuhan sebelumnya. Inokulasi Fase log mengindikasikan waktu yang diperlukan bakteri untuk mensintesis enzim yang dibutuhkan dalam metabolisme nutrisi baru [7].

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

- Kadar gula reduksi pada proses hidrolisis dengan penambahan enzim selulase lebih besar 13% dibanding dengan proses hidrolisis tanpa penambahan enzim selulase.
- pH optimum untuk fermentasi limbah serbuk gergaji menjadi biobutanol menggunakan bakteri *Clostridium acetobutylicum* adalah pH 5.
- Jumlah starter inokulum bakteri *Clostridium acetobutylicum* yang efektif pada proses fermentasi serbuk gergaji sebesar 10 ml.

B. Saran

- Sebaiknya diperlukan penelitian lebih lanjut tentang fermentasi butanol dengan menggunakan limbah bahan lignoselulosa lainnya.
- Perlu dicoba penelitian lebih lanjut tentang proses hidrolisis dalam berbagai kondisi, antara lain dalam kondisi asam, basa, atau proses hidrolisis lainnya.
- Sebaiknya diperlukan penelitian lebih lanjut tentang jumlah penambahan enzim pada proses hidrolisis.
- Hasil fermentasi berupa aseton dan etanol dapat dimanfaatkan untuk penelitian selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis H.D.F. mengucapkan terima kasih kepada Bapak Ir. Eddy Setiadi Soedjono, Dipl. Eng., M.Sc. PhD., selaku Ketua Jurusan Teknik Lingkungan serta dosen-dosen pengajar, karyawan dan laboran di Jurusan Teknik Lingkungan ITS untuk semua ilmu dan bantuan yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Antara <http://www.republika.co.id/berita/ekonomi/makro/11/09/20/1rtr-20-diperkirakan-537000-barelhari-impor-bbm-2012>, diakses pada 21 Februari 2012.
- Ohara, H., Karita S., Kimura T., Sakka K., and Ohmiya K., 1998. "Cellulase Complex from Ruminococcus albus". Annual Report IC Biotech Vol. 21. 358-370
- Whitman W.B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edition Volume: 3 The Firmicutes*. New York
- Noomtim P., dan Cheirsilp B., 2011. "Production of Butanol from Palm Empty Fruit Bunches Hydrolyzate by *Clostridium acetobutylicum*". 9th Eco-Energy and Materials Science and Engineering Symposium. Energy Procedia 9 : 140-146.
- Azhiihzaa. 2012. <http://azhiihzaa.blogspot.com/2012/03/pembuatan-media-pengenceran-dan.html>, diakses pada 20 Juli 2012.
- Qureshi N., Ezeji T.C., Ebener J., Dien B.S., Cotta M.A., Blaschek H.P. 2008. "Butanol production by *Clostridium beijerinckii*". Part I:

- [7] Jujubandung. <http://jujubandung.wordpress.com/2012/06/05/kurva-pertumbuhan-bakteri/>, diakses pada 23 Juni 2012.
- [8] Rahma A., Junita D., Wuri L., 2011. Pabrik Biobutanol dari Ubi Kayu. TA. Program Studi Teknik Kimia-ITB